

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249013

研究課題名(和文)神経筋シナプスの形成・維持機構と筋無力症の解明

研究課題名(英文)Molecular signaling in neuromuscular synaptogenesis and myasthenia

研究代表者

山梨 裕司 (Yamanashi, Yuji)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40202387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、独自に発見した「アダプター様分子Dok-7による受容体型キナーゼMuSKの筋管細胞内からの活性化」と言う分子機構が、神経筋シナプス(NMJ)の形成・維持シグナルの起点となることや、DOK7遺伝子の異常がDOK7型筋無力症の原因となることを発見し、Dok-7/MuSKシグナルがNMJの形成と維持に必須であることを解明した。そこで、本研究ではNMJの形成・維持機構の解明と、その破綻による筋無力症の理解と診断・治療基盤の形成を目指した。その結果、NMJの形成・維持に重要な新たなシグナル経路・シグナル分子を同定すると共に、NMJの人為的な拡張技術を開発し、疾患モデルマウスへの治療効果を示した。

研究成果の概要(英文)：We previously revealed that the cytoplasmic adaptor-like protein Dok-7 activates muscle-specific receptor tyrosine kinase MuSK, which is required for neuromuscular synaptogenesis and maintenance. To understand molecular signaling involved in neuromuscular synaptogenesis and myasthenia, we not only studied Dok-7 and MuSK-mediated signaling but also other signaling pathways in skeletal muscle. Our findings revealed that the chaperon protein Mesdc2 plays an important role in cell-surface expression of MuSK's co-receptor Lrp4, which is essential for NMJ formation and maintenance. Also, we found that the MuSK activator agrin has a separate role in postnatal maintenance of NMJ. Furthermore, we developed an adeno-associated viral vector (AAV-D7), which expresses Dok-7, and showed that AAV-D7 treatment enlarged NMJs and restored motor activities of DOK7 myasthenia model mice, resulting in enhancement of their survival.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

神経筋シナプスは神経筋接合部 (NMJ : Neuromuscular Junction) と呼ばれ、運動神経の軸索末端と筋管 (筋繊維) 中央部の後シナプス構造を連結し、アセチルコリン (ACh) を伝達物質とする骨格筋収縮の運動神経支配に必須の役割を担っている。それ故、NMJ の喪失は我々の呼吸を含めた運動機能の喪失を意味し、その機能不全は易疲労性の筋力低下や運動機能障害を引き起こす。この NMJ の形成と維持は筋特異的な受容体型チロシンキナーゼ MuSK によって制御されており、MuSK は共受容体である Lrp4 を介して運動神経由来のタンパク質 Agrin によって活性化されることが知られていた (図 1 の E18.5)。しかしながら、マウス胚の発生過程において、まず、MuSK 依存적でありながら運動神経を必要としない後シナプス構造の形成が先行し、引続き、後シナプス部位への運動神経軸索の伸展によって NMJ が形成されることが新たに報告され、未解明の筋管自律的な MuSK 活性化機構の存在と重要性が推論されていた。

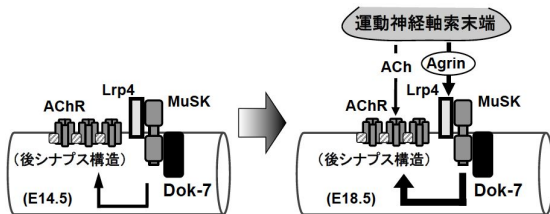


図1: NMJ 形成機構の模式図。マウス胚の発生過程中期 (E14.5) の筋管では Dok-7 による MuSK の活性化によって中央部分に ACh 受容体 (AChR) の凝集 (後シナプス構造) が誘導される。その後、当該部位へ伸展した運動神経の軸索末端から分泌された Agrin による MuSK のさらなる活性化やその他の未知シグナル (本文参照) によって NMJ が形成される (E18.5)。

その様な状況の下、代表者らは独自に単離した骨格筋のアダプター様分子 Dok-7 が MuSK の細胞内領域に直接作用し、活性化することが MuSK 依存的な後シナプス構造の形成、ひいては NMJ の形成と維持に必須であることを解明した。さらに、ヒト DOK7 遺伝子の異常による遺伝病 (DOK7 型筋無力症) を発見し、同疾患では Dok-7 の MuSK 活性化能の低下に伴う NMJ の形成不全が認められることを明らかにした。加えて、Dok-7 が Agrin による細胞外からの MuSK の活性化にも必須であることを示し、Dok-7 による筋管内での MuSK の活性化が後シナプス構造の形成を筋管自律的に誘導し、その後、運動神経軸索末端由来の Agrin による MuSK のさらなる活性化によって NMJ が形成・維持されることを明らかにした (図 1)。この Agrin の必要性については、NMJ での神経筋伝達時に、ACh が AChR の開口を促すだけでなく、その後シナプス領域での高密度の凝集を離散させる効果があり、その離散効果から後シナプス領域を防護するために必要であることが明らかとなっている。しかしながら、もし Agrin の存在意義が、Dok-7 による MuSK 活性化の補助のみであれば、なぜ、Dok-7 の発現レベルの増強で対応しな

いのかについては、謎のままであった。

他方 MuSK の共受容体である Lrp4 は、上述の通り、Agrin の直接の受容体として機能し、Agrin による MuSK 活性化に必須の役割を担っている。しかしながら、胎仔期の Agrin 非依存的、かつ、MuSK 依存的な後シナプス構造の形成にも Lrp4 が必須であることが明らかにされた。これは、我々が見出した、Dok-7 により MuSK が直接活性化される現象と見かけ上矛盾する知見であるが、本研究の開始時には、その実体は不明であった。

以上の通り、我々はマウスの胚発生の過程で認められる、運動神経や Agrin に非依存的な後シナプス構造の形成が、筋管細胞内のアダプター様分子である Dok-7 に依存的な MuSK 活性化によることを解明したが、なぜ、MuSK には二つの活性化因子 (Agrin と Dok-7) が存在するのか、また、なぜ、Dok-7 は MuSK を直接活性化できるにも関わらず、Lrp4 を失ったマウスでは、Dok-7 と MuSK 依存的な後シナプス構造の形成が認められないのかなど、Agrin、Lrp4、MuSK、Dok-7 による NMJ 形成シグナルには解明すべき課題が数多く残されていた。

2. 研究の目的

前項で述べた通り、我々は「アダプター様分子 Dok-7 による受容体型チロシンキナーゼ MuSK の筋管細胞内からの直接の活性化」と言う全く新しい分子機構が、神経筋シナプス (NMJ) の形成・維持シグナルの起点となることや、DOK7 遺伝子の異常が劣性の遺伝病である先天性筋無力症 (DOK7 型筋無力症) の原因となることを発見し、Dok-7 が NMJ の形成と維持に必須であることを解明した。そこで、本研究においては、NMJ の形成・維持の根幹をなす Dok-7 依存的な骨格筋シグナル経路に加え、運動神経と骨格筋の緊密な連携を支える未同定のシグナル経路の詳細を解明し、その破綻による疾病の理解と制御を目指す。特に、1) MuSK の二つの活性化因子である Dok-7 と Agrin の機能分担や、2) Dok-7 による MuSK 活性化における Lrp4 の機能、の解明を重要な研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) MuSK 活性化による NMJ の形成・維持機構の解析

MuSK シグナル分子の解析

上述の通り、Dok-7、Agrin、Lrp4 による受容体型チロシンキナーゼ MuSK の活性化が NMJ の形成・維持に必須であることは良く理解されているが、活性化された MuSK による NMJ の形成・維持機構の多くは未解明である。そこで、MuSK 活性化時のシグナル伝達について、プロテオミクスやジェノミクス解析による関連シグナル因子の同定を進めた。

Dok-7 による MuSK 活性化における Lrp4 機能の解析

我々は Dok-7 が直接、MuSK の細胞内領域に作用し、活性化できることを既に報告している。しかしながら、Lrp4 欠損マウスでは、Dok-7 と MuSK による筋管自律的な AChR の凝集誘導（後シナプス分化）が認められない。そこで、筋特異的に Dok-7 を高発現するトランスジェニックマウス（Dok-7 Tg マウス）を利用して、Dok-7 の高発現時にも、Lrp4 が MuSK 活性化や筋管自律的な後シナプス分化に必要かどうか、検討した。

Lrp4 制御機構の解析

Lrp4 については、それが MuSK 活性化に必須の役割を担っていることは理解されているが、その発現や機能の制御機構については未解明の部分が多い。そこで、本研究では Lrp4 会合分子の同定と Lrp4 の発現・機能制御機構について検討を進めた。

(2) MuSK 活性化以外の NMJ 形成・維持機構の解析

近年、FGF による前シナプス分化誘導や Laminin による NMJ の維持機構など、MuSK 活性化以外の NMJ 形成・維持機構が提唱されている。そこで、我々は Agrin が Laminin を含め、Lrp4 以外の多様な NMJ 関連分子にも会合できることに着目した。本研究では、上記 Dok-7 Tg マウスでの Dok-7 の高発現によって MuSK の活性化が高度に誘導されることを利用し、MuSK が十分に活性化されている状況での Agrin 依存的な NMJ 形成・維持機構の有無を検討した。

(3) 先天性筋無力症の原因遺伝子の探索

我々がヒト DOK7 遺伝子の劣性遺伝病として DOK7 型筋無力症を発見したように、上記の過程で同定された新たな NMJ 関連分子について、原因遺伝子が未同定の先天性筋無力症例での遺伝子変異の有無を検討した。

(4) NMJ 形成シグナルの増強による筋無力症治療技術の開発

NMJ 疾患である筋無力症には NMJ 形成不全を伴う症例が多く、NMJ 形成シグナルの人為的な増強による治療技術の開発が希求されている。そこで、本研究では、骨格筋への長期・高効率の遺伝子導入に適したアデノ随伴ウイルス（AAV）をベクターとして、Dok-7 の発現増強による NMJ 形成増強治療の開発研究を進めた。

(5) 重症筋無力症の新たな診断法の確立

重症筋無力症は NMJ の後シナプス部位に対する自己抗体により発症する自己免疫疾患であり、我々は独自に開発した高感度の検出法により抗 Lrp4 抗体陽性の重症筋無力症例を世界で初めて同定した。そこで、本研究では当該検出法に基づく診断法の確立を進めた。

4. 研究成果

(1) MuSK 活性化による NMJ の形成・維持機構の解析

MuSK シグナル分子の解析

マウス骨格筋の NMJ 形成部位と非形成部位の検体を調製し、主として発現プロファイル解析による網羅的な検討を行ったところ、NMJ 形成部位での発現が有意に高い遺伝子群を同定することができた。そこで、現在、これらの遺伝子産物が NMJ 構成因子や NMJ 形成制御因子であるか否かについて検討を進めている。

Dok-7 による MuSK 活性化における Lrp4 機能の解析

我々は、少なくとも *in vitro* の系では Dok-7 が MuSK の細胞内領域に直接作用し、活性化することを見出している。そこで、Dok-7 を筋特異的に過剰発現する Dok-7 Tg マウスに Lrp4 の欠失を導入することで、Dok-7 による MuSK 活性化での Lrp4 機能の解明を目指した。その結果、Lrp4 が発現していないマウスの骨格筋においても、Dok-7 の筋特異的な過剰発現により MuSK は活性化され、後シナプス分化が誘導されることが明らかになった。この結果は、個体においても Lrp4 非依存的に Dok-7 による MuSK 活性化が可能であることを示している。しかしながら、Lrp4 欠損 Dok-7 Tg マウスでの MuSK 活性化は、Lrp4 を発現する Dok-7 Tg マウスに比して極めて弱く、マウスの筋組織では Dok-7 による MuSK 活性化を Lrp4 が増強していることが解明された。

Lrp4 制御機構の解析

NMJ の形成・維持に必須の役割を担う Lrp4 の発現・機能制御機構について知る目的で、その会合分子の網羅的な探索を行った。その結果、細胞内のシャペロン分子として知られている Mesdc2 (Mesoderm development candidate 2) との特異的な会合が明らかになった。さらに、Mesdc2 が Lrp4 の糖鎖修飾と細胞表面上での発現に重要であることも解明された。上述の通り、Lrp4 が MuSK と複合体を形成し、筋管細胞膜上で神経由来の Agrin 受容体として機能していることを考えると、Mesdc2 が Lrp4 の機能の場での発現制御を介して、筋管細胞の後シナプス分化を制御している可能性が考えられた。そこで、Mesdc2 の発現を高度に抑制した培養筋管細胞を作出したところ、Agrin 依存的な後シナプス分化の有意な減弱が確認された。以上のことから、シャペロン分子である Mesdc2 が Lrp4 の細胞膜上での発現を正に制御することで、後シナプス構造の形成・維持に機能している可能性が明らかになった。

(2) MuSK 活性化以外の NMJ 形成・維持機構の解析

我々は Dok-7 が Agrin 非依存的に MuSK を

活性化できることや、AgrinによるMuSK活性化にDok-7が必要であることを発見したことから、なぜ、2種のMuSK活性化因子がNMJの形成と維持に必須であるのか、と言う疑問を抱いていた。そこで、Agrinの第2の機能について検討する意図を含め、Dok-7 Tg マウスでの筋特異的なDok-7の過剰発現によりMuSK活性化を維持した状態でのAgrin欠損の影響を検討した。その結果、Agrinの非存在下でも、Dok-7による高度のMuSK活性化によって、胎仔期のNMJは問題なく形成されることが判明し、胎仔のNMJ形成におけるAgrinに必須の機能は、Dok-7によるMuSK活性化で代替可能であることが示された。しかしながら、胎仔期に形成されたNMJは、出生直後から徐々に萎縮を開始し、5週齢では明らかな形成不全を呈し、AgrinをもたないDok-7 Tg マウスは8週齢までに全個体が致死となった。この事実は、AgrinがMuSK活性化とは異なる、それも、出生後のNMJの維持に必須の機能をもつことの発見であり、現在、この未知の機能の解明を進めている。

(3) 先天性筋無力症の原因遺伝子の探索

本研究から、既に発表したMesdc2を始め、複数の新規NMJ関連遺伝子が同定されている。現在、Mesdc2を含め、その遺伝子異常と先天性筋無力症との関連を検討している。

(4) NMJ形成シグナルの増強による筋無力症治療技術の開発

我々が世界に先駆けて作出したDok-7 Tg マウスでは、Dok-7の筋特異的な過剰発現によりMuSKが高度に活性化され、筋管上に形成されるNMJの後シナプス部位が拡張すると共に、対合する運動神経軸索末端の前シナプス部位も拡張し、NMJ全体が拡張した。しかしながら、当該マウスの運動機能には、NMJの拡張による明らかな障害は認められなかった。そこで、本研究では、Dok-7の発現誘導によるNMJ形成シグナルの増強を基盤とする筋無力症治療技術の開発研究を進めた。

Dok-7の発現誘導には、既に欧州にて承認された治療薬や、様々な治験にも使用されているアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を使用し、ヒトDOK7遺伝子の発現ベクター(AAV-D7)を作出した。このAAV-D7を8週齢の正常マウスに経静脈投与したところ、数日後に、NMJの顕著な拡張が確認された。そこで、我々が発見したヒトDOK7遺伝子の劣性遺伝病であるDOK7型筋無力症に高頻度に認められる異常に相当する遺伝子異常をマウスに導入し、生後9日齢で顕著な運動機能障害を呈するモデルマウス(DOK7型筋無力症マウス)を作出し、発症後のAAV-D7投与による治療効果を検証した。その結果、9日齢での投与により、投与後3日目には運動機能の改善が、また、投与後7日目には正常な運動機能の回復が認められ、DOK7型筋無力症マウスの早期の致死性も回避され、9日齢での

一回のAAV-D7投与による1年以上の延命効果が確認された。これらの成果は、少なくともマウスモデルにおけるAAV-D7の治療効果と高度の安全性を示すものである。

(5) 重症筋無力症の新たな診断法の確立

我々が抗Lrp4抗体陽性の重症筋無力症例を世界に先んじて報告した後、欧米を含めた多様な地域で抗Lrp4抗体陽性の重症筋無力症例が報告された。さらに、他のグループから、マウスモデルにおける当該抗体の病原性も確認され、当該疾患の診断法として、Lrp4抗体の測定が広く認められるようになった。残念ながら、Lrp4以外の抗体陽性例に対応する診断技術の確立には至らなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Tohru Tezuka, Akane Inoue, Taisuke Hoshi, Scott D. Weatherbee, Robert W. Burgess, Ryo Ueta, and Yuji Yamanashi. The MuSK-activator agrin has a separate role essential for postnatal maintenance of neuromuscular synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 16556-16561, 2014 (査読有)
2. Sumimasa Arimura, Takashi Okada, Tohru Tezuka, Tomoko Chiyo, Yuko Kasahara, Toshiro Yoshimura, Masakatsu Motomura, Nobuaki Yoshida, David Beeson, Shin'ichi Takeda, and Yuji Yamanashi. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science*, 345: 1505-1508, 2014 (査読有)
3. Ryosuke Doi, Mitsuharu Endo, Kimi Yamakoshi, Yuji Yamanashi, Michiru Nishita, So-ichiro Fukada and Yasuhiro Minami. Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/ β -catenin signal in myogenic cells during differentiation. *Genes Cells*, 19: 287-296, 2014 (査読有)
4. Taisuke Hoshi, Tohru Tezuka, Kazumasa Yokoyama, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, and Yuji Yamanashi. Mesdc2 plays a key role in cell-surface expression of Lrp4 and postsynaptic specialization in myotubes. *FEBS Letters*, 587: 3749-3754, 2013 (査読有)
5. Asma Ben Ammar, Payam Soltanzadeh, Stephanie Bauche, Pascale Richard, Evelyne Goillot, Ruth Herbst, Karen Gaudon, Caroline Huze, Laurent Schaeffer, Yuji Yamanashi, Osamu Higuchi, Antoine Taly, Jeanine Koenig, Jean-Paul Leroy,

- Faycal Hentati, Hossein Najmabadi, Kimia Kahrizi, Manouchehr Ilkhani, Michel Fardeau, Bruno Eymard, Daniel Hantai. A Mutation Causes MuSK Reduced Sensitivity to Agrin and Congenital Myasthenia. *PLoS One*, 8: e53826, 2013 (査読有)
6. Yuji Yamanashi, Tohru Tezuka, and Kazumasa Yokoyama. Activation of receptor protein-tyrosine kinases from the cytoplasmic compartment. *J. Biochem.*, 151: 353-359, 2012 (査読有).
7. Aya Kawamata, Akane Inoue, Daisuke Miyajima, Hiroaki Hemmi, Ryuichi Mashima, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Teruo Amagasa, Yuji Yamanashi*, and Masaki Noda*. (*corresponding authors) Dok-1 and Dok-2 deficiency induces osteopenia via activation of osteoclasts. *J. Cell. Physiol.* 226: 3087-3093, 2011 (査読有)

〔学会発表〕(計 2件)

1. 山梨裕司 「運動機能障害に対する新規治療技術の創出」、日本学術会議 公開シンポジウム 「薬を生み出すシグナル生物学」、日本学術会議講堂(東京)1月10日、2014年
2. Yuji Yamanashi. Plenary Lecture: Dok-7, MuSK, and the development of neuromuscular junction. 12th International Conference on Myasthenia Gravis and Related Disorders (organized by the New York Academy of Sciences). New York, USA. May 21-23, 2012

〔図書〕(計 1件)

1. 有村純暢、山梨裕司：神経筋接合部の形成不全を伴う神経筋疾患に対する新規治療概念の創出、実験医学、羊土社、33巻(3月号)、2015、p603-606

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/genetics/html/home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山梨 裕司 (YAMANASHI YUJI)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：40202387

(2)研究分担者

手塚 徹 (TEZUKA TOHRU)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：50312319

(3)連携研究者

濡木 理 (NUREKI OSAMU)
東京大学・理学系研究科・教授
研究者番号：10272460

夏目 徹 (NATSUME TOHRU)
産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・センター長
研究者番号：00357683

武田 伸一 (TAKEDA SHIN'ICHI)
国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・部長
研究者番号：90171644

本村 政勝 (MOTOMURA MASAKATSU)
長崎総合科学大学・工学部・教授
研究者番号：70244093